

541 594
07 JUL 2005

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 août 2004 (19.08.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/069279 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 47/42, C12N 15/87
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003951
- (22) Date de dépôt international :
31 décembre 2003 (31.12.2003)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
03/00093 7 janvier 2003 (07.01.2003) FR
- (71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). ECOLE NORMALE SUPERIEURE [FR/FR]; 45, rue d'Ulm, F-75230 Paris Cedex 05 (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : PROCHIANTZ, Alain [FR/FR]; 8, rue Marie-Pape Carpentier, F-75006 Paris (FR). DUPONT, Edmond [FR/FR]; 46, rue du Fer à Moulin, F-75005 Paris (FR). JOLIO, Alain [FR/FR]; 34, rue des Citeaux, F-75012 Paris (FR). TREMBLEAU, Alain [FR/FR]; 43, rue de la Sablière, F-95330 Yerres (FR). VOLOVITCH, Michel [FR/FR]; 107, rue Monge, F-75005 Paris (FR).
- (74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie José etc.;
Cabinet Ores, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(54) Title: COMPOSITION FOR INTRACELLULAR TRANSPORT OF BIOLOGICAL PARTICLES OR MACROMOLECULES

(54) Titre : COMPOSITION POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE MACROMOLECULES OU PARTICULES BIOLOGIQUES

(57) Abstract: The invention relates to a composition comprising a macromolecule or particle having one or several hydrophobic domains on the surface thereof whereby at least one transducer peptide is adsorbed thereon. Said composition can be used to introduce the macromolecule or particle into living cells.

(57) Abrégé : L'invention concerne une composition comprenant une macromolécule ou une particule présentant à sa surface un ou plusieurs domaines hydrophobes, sur le(s)quel(s) est adsorbé au moins un peptide transducteur. Cette composition est utilisable pour introduire ladite macromolécule ou particule dans des cellules vivantes.

BEST AVAILABLE COPY

COMPOSITION POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE MACROMOLECULES OU PARTICULES BIOLOGIQUES.

La présente invention est relative à de nouveaux moyens de transfert intracellulaire de macromolécules ou de particules d'intérêt.

L'importation de macromolécules, et notamment de polynucléotides ou de protéines, dans des cellules animales vivantes constitue une approche de base, aussi bien pour la recherche fondamentale que dans le cadre de diverses applications, par exemple en thérapie génique.

L'une des difficultés majeures de cette approche résulte de la nécessité de transporter ces macromolécules à travers la membrane cellulaire.

Ce problème a fait l'objet de nombreuses recherches, qui ont abouti à la mise au point de différentes méthodes de transfert intracellulaire et de différents types de vecteurs.

Ainsi, l'introduction de polynucléotides dans les cellules repose actuellement pour l'essentiel sur des techniques de transfection (phosphate de calcium, électroporation), de lipofection (liposomes, lipides chargés) ou d'infection virale (lentivirus, adénovirus, virus de l'herpès, etc.) ou sur l'utilisation de nanoparticules.

Plus récemment, il a été proposé d'utiliser des peptides transducteurs. On désigne sous ce terme des peptides comprenant, ou constitués par, une séquence dénommée " domaine de transduction " leur conférant la capacité de pénétrer à l'intérieur d'une cellule vivante, indépendamment de la présence de transporteurs ou de récepteurs spécifiques.

Des articles de revue concernant les peptides transducteurs ont été publiés récemment par LIDGREN et al., TIPS, 21, 99-102, (2000) ; SCHWARZE et DOWDY TIPS, 21, 45-48, (2000) ; SCHWARZE et al. Trends Cell. Biol., 10, 290-295, (2000) ; PROCHIANTZ Current Opinion in Cell Biology, 12, 400-406, (2000) ; Cell-Penetrating Peptides. Processes and applications. Ed. Ulo Langel. CRC Press (2002).

A titre d'exemples de peptides transducteurs, on citera en particulier :

- les pénétratines, qui sont des peptides dérivés de la troisième hélice d'un homéodomaine ; des peptides de la famille des pénétratines sont décrits par exemple dans les publications de JOLIOT et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1864-1868, (1991) ; DEROSI et al. J. Biol. Chem., 269, 14, 10444-10450, (1994) ; BRUGIDOU et al. Biophys. Biochem. Res. Com., 214, 685-693, (1995), ainsi que dans le Brevet US 5888762, le Brevet US 6080724, ou la Demande PCT WO 00/01417 ;

- les peptides dérivés de la protéine Tat de HIV1, et en particulier du fragment 48-60 de ladite protéine ; de tels peptides sont décrits par exemple par FAWELL et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 664-668, (1994) ou par VIVES et al. J. Biol. Chem., 272, 16010-16017, (1997).

- les peptides dérivés de la protéine VP22 de HSV ; de tels peptides sont décrits par exemple par ELLIOTT et O'HARE Cell, 88, 223-233, (1997) ;

- des peptides dérivés d'une séquence signal conjuguée à une séquence de localisation nucléaire ; de tels peptides sont décrits par exemple par LIN et al. J. Biol. Chem., 270, 14255-14258, (1995) ; J. Biol. Chem., 271, 5305-5308, (1996), LIU et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11819-11824, (1996), MORRIS et al. Nucleic Acids Res., 25, 2730-2736, (1997), CHALOIN et al. Biochemistry, 36, 11179-11187, (1997) ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 243, 601-608, (1998), ZHANG et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9184-9189, (1998) ;

- les transportanes qui sont dérivés d'une fusion entre une portion d'un neuropeptide, la galanine, et un peptide du venin de guêpe POOGA et al., FASEB J., 12, 67-77, (1998) ; Ann. New York Acad. Sci., 863, 450-453, (1998).

Les peptides transducteurs peuvent importer dans des cellules vivantes, notamment des cellules animales, des molécules ou complexes moléculaires de nature variée (acides

nucléiques, protéines, peptides/acides nucléiques, analogues de nucléotides, liposomes).

Ces molécules ou complexes moléculaires sont habituellement désignés sous le terme général de " cargos ".

Il a été rapporté que certains peptides transducteurs pouvaient importer des cargos de taille importante.

Ainsi, LEWIN et al. (Nat. Biotech, 18, 410-414, 2000) ont conjugué un dérivé du peptide transducteur TAT 48-60 à des nanoparticules constituées d'un noyau d'oxyde de fer enrobé d'une enveloppe de dextrane, et ont observé que les nanoparticules ainsi modifiées (de diamètre 45 nm) étaient importées dans des cellules vivantes.

EGUCHI et al. (J. Biol. Chem., 276, 28, 26204-26210, 2001) ont construit des phages λ recombinants exprimant à leur surface une protéine chimérique comprenant le peptide transducteur TAT fusionné à l'extrémité N-terminale de la protéine D du phage, et contenant un gène marqueur. Ils ont observé, après incubation de ces phages avec des cellules COS-1 en culture, une expression intracellulaire du gène marqueur dans une proportion de ces cellules pouvant aller jusqu'à 30%.

Il est toutefois généralement considéré que l'une des limitations majeures des peptides transducteurs mentionnés ci-dessus, tels que les pénétratines ou les peptides TAT, réside dans la nécessité de coupler par liaison(s) covalente(s) le peptide transducteur et le cargo.

Dans le but de s'affranchir de cette limitation, des peptides conçus pour se lier par interactions ioniques ou hydrophobes soit avec des acides nucléiques soit avec des protéines, ont été construits. L'un de ces peptides, dénommé MPG, est destiné au transport intracellulaire d'acides nucléiques (MORRIS et al., Nucl. Acids Res., 2730-2736, 1997 ; Nucl. Acids Res., 3510-3517, 1999) ; il comprend deux régions distinctes, séparés par un peptide de liaison : une région hydrophobe N-terminale dérivée de la séquence signal riche en glycine de la protéine gp41 de HIV1, permettant la

fusion avec la membrane cellulaire, et une région hydrophile dérivée de la séquence de localisation nucléaire de l'antigène T de SV40, permettant l'interaction du peptide avec l'acide nucléique, et son adressage nucléaire.

5 L'autre, dénommé Pep-1 (MORRIS et al., Nature Biotech, 19, 1173-1176, 2001) est destiné au transport de protéines. Il diffère de MPG par la nature de la région hydrophobe N-terminale, qui est constituée par une séquence
10 riche en tryptophane, destinée à permettre l'adressage à la membrane cellulaire et la formation d'interactions hydrophobes avec les protéines.

Ces deux types de peptides sont également décrits dans la demande PCT WO 02/10201, qui propose, de manière générale, d'utiliser pour importer des protéines dans des
15 cellules vivantes des peptides de 16 à 30 acides aminés comprenant deux domaines successifs distincts : un domaine hydrophobe, contenant 3 à 5 résidus tryptophane dont au moins une paire Trp-Trp, alternant avec des résidus acide glutamique et thréonine ; un domaine hydrophile contenant 4
20 ou 5 résidus basiques (lysine ou arginine) consécutifs, ces deux domaines étant éventuellement séparés par un domaine espaceur contenant un résidu proline ou un résidu glutamine. Une importation efficace n'a été toutefois observée que dans le cas des peptides portant en outre un groupe cystéamine.

25 Par ailleurs, dans le cadre de travaux sur les propriétés des peptides transducteurs de la famille des pénétratines les Inventeurs ont évalué la capacité de ces peptides à importer des cargos de taille importante. Dans ce but, ils ont testé l'un de ces peptides, en utilisant comme
30 cargo un phage λ . Ils ont alors constaté non seulement que ce peptide était capable d'importer le phage dans une cellule animale, mais encore que, contrairement à ce que l'on supposait jusqu'à présent, l'importation pouvait s'effectuer sans qu'il soit nécessaire de coupler le peptide et le phage
35 par liaison covalente. En outre les Inventeurs ont constaté que l'efficacité de cette importation était bien supérieure à celle observée par EGUCHI et al. avec le peptide transducteur

TAT couplé par liaison peptidique à l'extrémité N-terminale de la protéine D du phage λ .

Pour expliquer ces résultats, surprenants au vu de la différence de structure entre les pénétratines et les peptides de la Demande PCT WO 02/10201, les Inventeurs proposent l'hypothèse suivante : les pénétratines ont un domaine de transduction capable d'adopter une structure secondaire (en hélice α ou en feuillet β) amphiphile, possédant une face présentant des résidus hydrophobes, et une face chargée comprenant un résidu tryptophane encadré par 2 résidus basiques assurant l'interaction avec les membranes et la formation d'une micelle inverse permettant l'internalisation du peptide dans la cellule. Par exemple, dans le cas de la pénétratine-type pANTP, les résidus Ile, Trp, Phe en positions 3, 14, et 7 de la séquence peptidique, forment dans l'hélice α un triplet hydrophobe ; ce triplet hydrophobe est distant de la zone chargée constituée par les résidus Lys (position 13 de la séquence peptidique) et Arg (position 10 de la séquence peptidique), qui dans l'hélice α encadrent le résidu Trp en position 6 de la séquence peptidique (DEROSSI et al. J. Biol. Chem, 271, p 18188-18193, 1996).

Il est supposé que la face hydrophobe du domaine de transduction permet la formation d'interactions de force suffisante pour assurer une fixation stable du peptide transducteur au cargo. L'interaction avec la membrane se ferait par la face chargée du domaine de transduction ; le Trp encadré par deux acides aminés chargés peut s'insérer dans la membrane, (cette insertion a été observée par des études de fluorescence du tryptophane), la déstabilisant et permettant le passage du vecteur et de son cargo.

La présente invention a pour objet un procédé pour préparer une composition permettant d'introduire dans une cellule vivante, en particulier une cellule eucaryote, et notamment une cellule animale, un cargo constitué par une macromolécule ou un assemblage moléculaire (par exemple une particule), de taille inférieure ou égale à environ 1 μm dans

sa plus grande dimension, ledit cargo présentant à sa surface un ou plusieurs domaines hydrophobes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend l'adsorption sur le ou lesdits domaines hydrophobes, d'au moins un peptide transducteur, à l'exception des peptides décrits dans la Demande PCT WO 02/10201.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit cargo est une protéine ou une particule possédant une surface de nature protéique.

Il est également possible d'utiliser comme cargo des liposomes, des nanoparticules, des glycolipides, ou toute combinaison macromoléculaire naturelle ou artificielle.

Selon un autre mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit cargo est généralement de taille inférieure ou égale à 500 nm dans sa plus grande dimension.

Ceci englobe par exemple des particules virales ou pseudovirales, notamment des particules phagiques.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit peptide transducteur est un peptide de la famille des pénétratines.

On définit ici comme " peptide de la famille des pénétratines " tout peptide comprenant un domaine de transduction capable d'adopter une structure secondaire amphiphile (en hélice α ou en feuillet β) présentant une face comprenant des résidus hydrophobe permettant l'interaction avec le cargo, et une face permettant l'interaction avec les membranes, comprenant un résidu tryptophane encadré de résidus basiques.

Ceci englobe notamment les pénétratines décrites dans la demande PCT WO 00/01417, et plus particulièrement celles comprenant un domaine de transduction défini par l'une des formules ci-après :

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}$ (I)

$X_{16}-X_{15}-X_{14}-X_{13}-X_{12}-X_{11}-X_{10}-X_9-X_8-X_7-X_6-X_5-X_4-X_3-X_2-X_1$ (Ia)

dans laquelle X_6 représente un résidu tryptophane, X_1 , X_2 , X_4 , X_9 , X_{15} , X_{16} , sont des acides aminés

non-hydrophobes et X₃, X₇, et X₁₄, sont des acides aminés hydrophobes.

Des domaines de transduction particulièrement préférés pour la mise en œuvre de la présente invention sont ceux dans lesquels X₁₀ et X₁₃ sont des acides aminés basiques.

On peut également utiliser des dérivés de pénétratines, par exemple certaines des pénétratines tronquées ou substituées décrites dans la Demande PCT WO 00/01417, ou la Demande PCT WO 00/29427.

On peut aussi utiliser un peptide transducteur comprenant, outre le domaine de transduction, un ou plusieurs autres domaines fonctionnels ; à titre d'exemple, on citera les peptides comprenant un domaine de transduction et une séquence d'export nucléaire décrits dans la Demande PCT WO 02/39947.

L'adsorption du peptide transducteur s'effectue de manière simple, par incubation pendant au moins 15 minutes, de préférence pendant 30 à 60 minutes, dudit peptide transducteur avec le cargo.

L'incubation peut s'effectuer *ex vivo* ou *in vivo*, dans une gamme de températures très large, généralement comprise entre 15 et 40°C. On opérera de préférence à température ambiante, c'est-à-dire aux environs de 20 à 25°C, ou aux températures physiologiques (aux environs de 37°C), dans un milieu à pH neutre ; il peut s'agir par exemple d'un milieu de culture pour cellules, ou d'une solution de NaCl (9 g/l).

Le rapport molaire peptide transducteur/cargo dans le milieu d'incubation dépend notamment de la taille du cargo, par exemple, dans le cas d'un bactériophage, on peut utiliser un rapport molaire correspondant à 1.000 à 500.000 molécules de peptide par bactériophage.

La présente invention a également pour objet une composition comprenant un cargo à la surface duquel est adsorbé un peptide transducteur, susceptible d'être obtenue par le procédé conforme à l'invention.

Les compositions conformes à l'invention peuvent être utilisées immédiatement après leur préparation ; le cas échéant, elles peuvent également être conservées pendant au moins 3 jours dans le milieu d'incubation, à des températures comprises entre 4°C et 37°C environ.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de compositions conformes à l'invention pour introduire un cargo, tel que défini ci-dessus, dans une cellule vivante.

En particulier la présente invention a ainsi pour objet un procédé pour introduire un cargo dans une cellule vivante, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact de ladite cellule avec une composition conforme à l'invention comprenant ledit cargo.

Le procédé conforme à l'invention peut être mis en œuvre sur des cellules en culture, par addition à la culture d'une composition conforme à l'invention, et incubation pendant 1 à 14 heures, de préférence pendant 2 à 6 heures.

De préférence, la composition conforme à l'invention est utilisée à raison de 10.000 à 20.000 complexes cargo/peptide transducteur par cellule.

Le procédé conforme à l'invention peut également être mis en œuvre *in vivo*, par exemple par injection d'une composition conforme à l'invention à un animal.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une composition conforme à l'invention pour l'obtention d'un médicament, et en particulier en tant que vecteur d'un principe actif constitué par le cargo ou contenu dans celui-ci.

La présente invention présente l'avantage de permettre d'introduire dans des cellules vivantes tout cargo hydrophobe ou dont la surface présente au moins un domaine hydrophobe, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer un couplage préalable par liaison covalente entre le cargo et le peptide transducteur. La présente invention présente un intérêt tout particulier pour introduire dans des cellules

vivantes des particules virales ou pseudovirales, notamment des bactériophages, renfermant des polynucléotides d'intérêt que l'on souhaite exprimer dans lesdites cellules.

Ces particules peuvent ainsi être utilisées par exemple comme vecteurs de thérapie génique, *in vivo* ou *ex vivo*. On peut également préparer des compositions conformes à l'invention à partir de banques de phages contenant des polynucléotides codant pour des polypeptides divers, susceptibles de modifier le comportement de certaines cellules (migration, prolifération, différenciation, etc.), et utiliser ces compositions pour faire entrer ces banques de phages dans des tissus, en culture ou *in vivo*, et identifier des séquences régulatrices de ces comportements.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs, illustrant la mise en œuvre de la présente invention, pour introduire des phages dans des cellules vivantes.

EXEMPLE 1 : ADSORPTION D'UN PEPTIDE TRANSDUCTEUR SUR DES BACTERIOPHAGES LAMDA

Préparation des phages :

Le gène de la protéine autofluorescente EGFP (CLONTECH) ou celui de l'homéoprotéine En2 (Engrailed2) de poulet (LOGAN et al., 1992, Dev Genetics 13: 345-358) ont été placés sous le contrôle du promoteur CMV et en amont de la séquence de polyadénylation de SV40, dans un plasmide dérivé de pBK-CMV (STRATAGENE) possédant un site EcoRI unique en amont du promoteur CMV, et un site SalI unique en aval du signal de polyadénylation.

La fonctionnalité de ces constructions a été vérifiée par électroporation et expression transitoire en cellules COS, et détection de l'autofluorescence de la GFP ou détection immunocytochimique de la protéine Engrailed 2 à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre cette protéine (don du Dr S. SAULE, UMR 146, Institut Curie, Orsay)).

Le fragment encadré par les deux sites uniques (EcoRI et SalI) a ensuite été transféré dans le génome du phage Lambda-ZAP (STRATAGENE), entre les sites EcoRI et XhoI, et l'ADN recombinant a été encapsidé *in vitro* à l'aide des réactifs GIGAPACK PLUS (STRATAGENE). Les phages résultants (respectivement dénommés Lambda-ZAP-GFP et Lambda-ZAP-En2) ont permis l'infection de bactéries compétentes (souche XL1Blue-MRF', STRATAGENE), puis ont été titrés et stockés après un premier tour d'amplification. Pour contrôler la qualité des recombinants obtenus, les phagemides internes aux génomes des phages Lambda recombinants ont été excisés automatiquement par co-infection de bactéries XL1Blue-MRF' avec un phage auxilliaire (ExAssist, STRATAGENE). Après culture en milieu liquide, les bactéries encore vivantes et les virions Lambda sont détruits par chauffage, et on récupère les phages filamenteux recombinants. Les formes plasmidiques de ces phagemides recombinants sont récupérées après infection de bactéries non permissives pour la réplication du phage filamenteux (souche SOLR, STRATAGENE), et l'intégrité fonctionnelle des plasmides excisés est vérifiée par électroporation dans les cellules COS. Après cette vérification, les phages Lambda recombinants sont amplifiés pour atteindre un titre d'au moins 10^{11} particules par ml, puis concentrés au PEG, dialysés contre du PBS additionné de Ca^{++} et de Mg^{++} , et stockés à 4°C.

Adsorption du peptide transducteur :

Le peptide transducteur utilisé est une pénétratine de séquence :

RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:1)

correspondant à l'hélice 3 du peptide pAntp (homéodomaine de la protéine Antennapedia de drosophile).

La pénétratine biotinylée est mélangée aux phages recombinants, à raison de 10 µg de peptide pour 10^9 particules phagiques, dans 50 à 100 µl de milieu approprié (milieu DMEM/F12 (1:1) ou PBS-Dulbecco). Le mélange est incubé à température de la pièce pendant 30 min.

EXEMPLE 2 : INTRODUCTION DE PHAGES DANS DES CELLULES EN CULTURE

Les cellules utilisées sont des cellules épithéliales de rein de chien (MDCK).

5 Les phages utilisés sont marqués au fluorochrome Cy3 (AMERSHAM) par liaison covalente du fluorochrome aux protéines de capsid, selon les instructions du fabricant. Ils sont ensuite incubés en présence de pénétratine, comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus. A titre de contrôle négatif,
10 on utilise des phages marqués au fluorochrome Cy3, incubés dans les mêmes conditions en l'absence de pénétratine.

La préparation phages/pénétratine, ou la préparation témoin est ajoutée au milieu de culture ou de suspension des cellules (selon que les cellules traitées ont
15 déjà étéensemencées ou qu'elles viennent d'être dissociées) à raison de 10.000 phages/cellule, et laissée au contact des cellules pendant 4 heures.

Les cellules sont ensuite lavées et remises en culture dans du milieu frais, puis fixées dans du
20 paraformaldéhyde 4% en PBS durant 10 min à température ambiante, rincées en PBS et montées dans du milieu de montage pour spécimens fluorescents DAKO contenant 1µg/ml de DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole). Elles sont ensuite observées sous un microscope confocal à épifluorescence type Leica TCS.
25 Les images sont analysées et traitées à l'aide du logiciel PHOTOSHOP d'Adobe.

Les résultats sont illustrés par la Figure 1 :

Figure 1 A : préparation témoin avec phage sans pénétratine

30 Figure 1 B : préparation phage/pénétratine

On observe une importante fluorescence intracellulaire chez les cellules ayant reçu la préparation phages/pénétratine. En revanche, dans le cas des cellules n'ayant reçu que la préparation de phages, aucune
35 fluorescence n'est observée.

EXEMPLE 3: INTRODUCTION DE PHAGES LAMBDA IN VIVO DANS DES CELLULES DE CERVEAU DE SOURIS

Différentes préparations phages/pénétratine (phages recombinants exprimant la GFP ; phages recombinants exprimant En2 ; phages marqués au fluorochrome Cy3) sont administrées à des souris adultes par infusion dans le ventricule latéral du cerveau.

A J-1 avant l'infusion, les phages (solution à $6,5 \cdot 10^8$ pfu/ μ l) sont dialysés contre du NaCl 0,9% contenant 10 mM de MgCl₂ (pour la stabilité du phage) à 4°C durant la nuit. Le jour de l'infusion, on réalise le mélange phage/pénétratine : 70 μ l de la solution de phages dialysés contre du NaCl 0,9% (soit $6,5 \cdot 10^{10}$ pfu) + 3 μ l de NaCl 9% + 27 μ l de la solution stock de pénétratine (soit 162 μ g), soit environ 5×10^5 molécules de pénétratine par particule de phage. 100 μ l de mélange sont chargés dans une micro-pompe osmotique (ALZET 1003D) reliée par un cathéter à une canule qui sera implantée dans le ventricule latéral. L'ensemble de la micro-pompe est plongé dans du NaCl 0,9% à 37°C pendant 4 heures afin d'en amorcer le débit.

Les pompes sont placées dans une poche sous-cutanée au niveau de la région scapulaire de l'animal, et la canule implantée dans le ventricule latéral du cerveau selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes : latéral 0,8 mm, antéro-postérieur 0mm, dorso-ventral 2mm par rapport au Bregma du crâne pris comme origine des coordonnées.

L'infusion est effectuée durant trois jours à un débit de 1 μ l/heure. Les animaux infusés sont ensuite euthanasiés par anesthésie suivie d'une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde 4% en PBS ; les cerveaux sont prélevés et post-fixés la nuit à 4°C dans ce fixateur. Le lendemain, ils sont découpés au vibratome en coupes frontales de 50 μ m d'épaisseur.

Les coupes sont soit observées immédiatement après montage dans du milieu de montage (DAKO+DAPI) dans le cas d'une fluorescence directe (GFP ou CY3), soit utilisées pour l'immunodétection de la protéine hétérologue exprimée

par le phage (dans le cas du phage exprimant la GFP ou En2). La pénétratine est détectée par une streptavidine couplée au fluorochrome Cy3 (IMMUNOTECH)

5 Pour l'immunodétection, et/ou la détection de la pénétratine, les coupes sont préincubées environ une heure dans du tampon PBS 5% SVF 0,25% Triton X-100 (PBST) à température ambiante. Les anticorps sont dilués dans le même tampon, au 1/5000 pour l'anticorps polyclonal anti-En2, et au 1/500 pour l'anticorps polyclonal l'anti-GFP (SANTA-CRUZ), et 10 incubés avec les coupes la nuit à 4°C. Les coupes sont ensuite rincées 3x15min dans du tampon PBS ; un anticorps secondaire fluorescent anti-immunoglobulines de lapin couplé au FITC (JACKSON) est ensuite ajouté après dilution au 1/500ème en PBST.

15 Pour la détection de la pénétratine, la streptavidine fluorescente est diluée au 1/500ème dans le PBST.

20 Après incubation d'une heure à température ambiante, et trois rinçages de 15 min dans du PBS, les coupes sont montées en milieu DAKO+DAPI, et observées en microscopie confocale à épifluorescence.

Les résultats sont illustrés par les Figures 2 et 3 :

25 Les figures 2 A et 2 B représentent des marquages sur des coupes frontales de 50µm d'épaisseur.

Figure 2 A : Détection de phage cy3 dans le parenchyme cérébral d'une souris adulte après infusion du mélange pénétratine/phage dans le ventricule latéral.

30 Figure 2 B : détection d'une fluorescence GFP dans le parenchyme cérébral d'une souris adulte après infusion du mélange pénétratine/phage GFP dans le ventricule latéral

35 Figure 3 : Colocalisation de la protéine engrailed 2 et de la pénétratine dans le parenchyme cérébral d'une souris adulte après infusion du mélange pénétratine/phage codant pour En 2.

Figure 3 A : immunodétection de la protéine Engrailed 2 codée par le phage

Figure 3 B : détection sur la même coupe de la pénétratine à l'aide de streptavidine fluorescente

5 Les figures 3 D et 3 E sont respectivement des agrandissements des figures 3 A et 3 B

REVENDICATIONS

1) Procédé pour préparer une composition permettant d'introduire dans une cellule vivante, un cargo constitué par une macromolécule ou un assemblage moléculaire de taille inférieure ou égale à environ 1 μm dans sa plus grande dimension et présentant à sa surface un ou plusieurs domaines hydrophobes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend l'adsorption sur le ou lesdits domaines hydrophobes, d'au moins un peptide transducteur, à l'exception des peptides transducteurs de 16 à 30 acides aminés comprenant un domaine hydrophobe contenant 3 à 5 résidus tryptophane dont au moins une paire Trp-Trp, alternant avec des résidus acide glutamique et thréonine, et un domaine hydrophile contenant 4 ou 5 résidus basiques consécutifs.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le cargo est une protéine ou une particule possédant une surface de nature protéique.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le cargo est une particule virale ou pseudovirale.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le cargo est un bactériophage.

5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le peptide transducteur est un peptide de la famille des pénétratines.

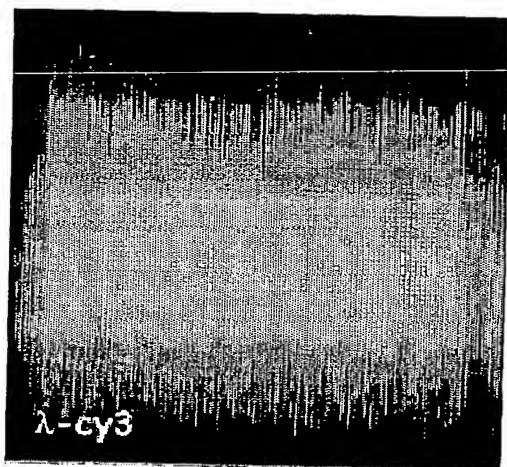
6) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'adsorption du peptide transducteur est effectuée par incubation pendant au moins 15 minutes dudit peptide transducteur avec le cargo.

7) Composition comprenant un cargo à la surface duquel est adsorbé un peptide transducteur, susceptible d'être obtenue par un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 6.

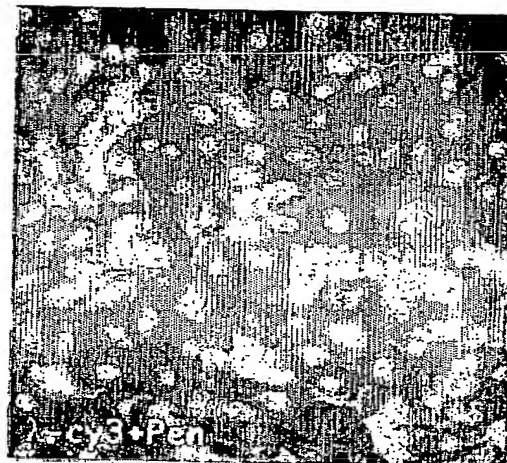
8) Utilisation d'une composition selon la revendication 7 pour introduire ledit cargo dans une cellule vivante en culture.

9) Utilisation d'une composition selon la
revendication 7 pour l'obtention d'un médicament.

1/3



A

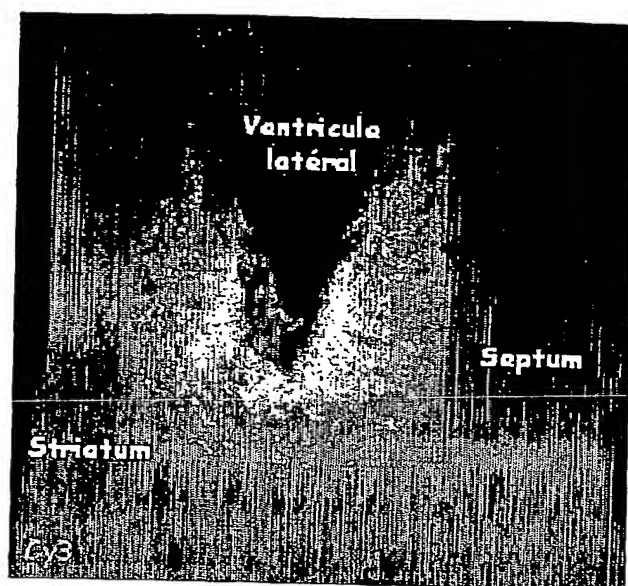


B

Fig. 1

2/3

A



B

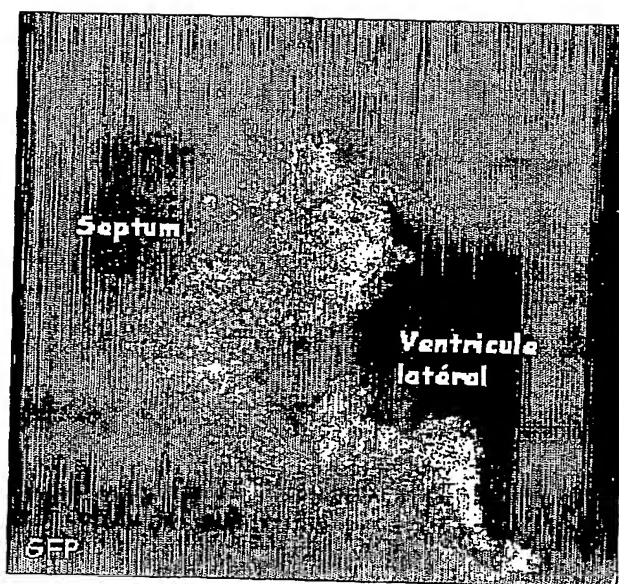


Fig. 2

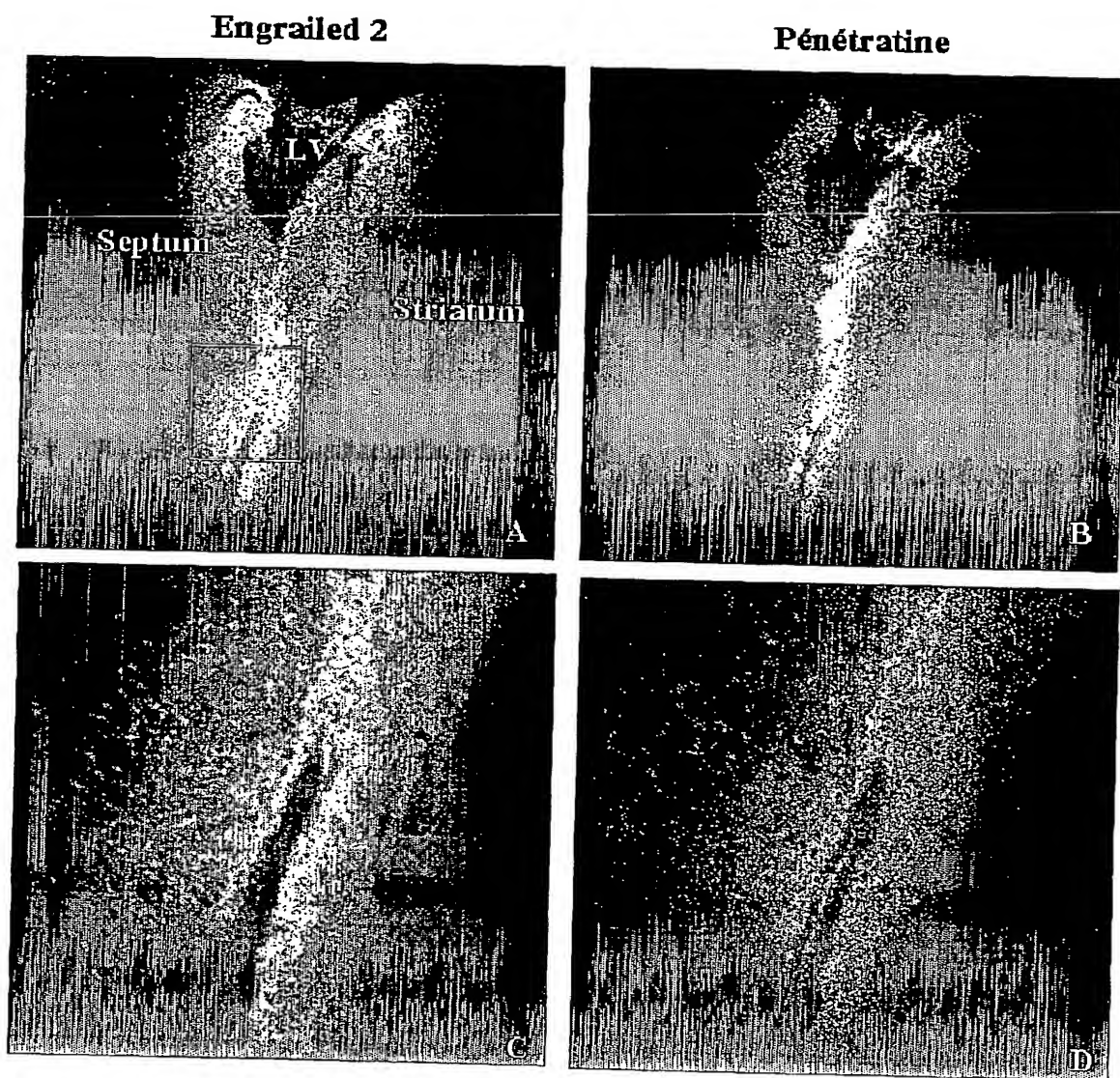
$\frac{3}{3}$ 

Fig. 3

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NORMALE SUPERIEURE
PROCHIANZ, Alain
DUPONT, Edmond
JOLIOT, Alain
TREMBLEAU, Alain
VOLOVITCH, Michel

<120> COMPOSITION POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE MACROMOLECULES
OU PARTICULES BIOLOGIQUES

<130> MJPbv644/91

<150> FR 0300093

<151> 2003-01-07

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<220>

<223> hélice 3 de l'homéodomaine de pAntp

<400> 1

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K47/42 C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/10201 A (DIVIDA GILLES ;MERY JEAN (FR); HEITZ FREDERIC (FR); MORRIS MAY (FR) 7 February 2002 (2002-02-07) cited in the application	1-4, 6-9
Y	page 12, line 1-25; claims 1-7, 50-54; example 4	5
Y	WO 00/01417 A (CYCLACEL LTD ;WANG SHUDONG (GB); FISCHER PETER MARTIN (GB)) 13 January 2000 (2000-01-13) cited in the application the whole document	5

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

24 May 2004

Date of mailing of the International search report

07/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

FR 03/03951

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DEROSS D (REPRINT) ET AL: "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery" TRENDS IN CELL BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD, XX, vol. 8, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 84-87, XP002122131 ISSN: 0962-8924 figure 1; table 1</p>	5
A	<p>EGUCHI AKIKO ET AL: "Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 28, 13 July 2001 (2001-07-13), pages 26204-26210, XP002253384 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 03/03951

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0210201	A	07-02-2002	AU 8076701 A	13-02-2002
			CA 2417454 A1	07-02-2002
			EP 1305333 A1	02-05-2003
			WO 0210201 A2	07-02-2002
			US 2003119725 A1	26-06-2003
WO 0001417	A	13-01-2000	AU 756014 B2	02-01-2003
			AU 4519899 A	24-01-2000
			CA 2333145 A1	13-01-2000
			EP 1093383 A1	25-04-2001
			WO 0001417 A1	13-01-2000
			GB 2340121 A ,B	16-02-2000
			HU 0300246 A2	28-05-2003
			JP 2002519392 T	02-07-2002
			US 2003119735 A1	26-06-2003
			US 6472507 B1	29-10-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donnée Internationale No

P R 03/03951

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K47/42 C12N15/87

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 02/10201 A (DIVIDA GILLES ; MERY JEAN (FR); HEITZ FREDERIC (FR); MORRIS MAY (FR) 7 février 2002 (2002-02-07) cité dans la demande	1-4, 6-9
Y	page 12, ligne 1-25; revendications 1-7, 50-54; exemple 4	5
Y	WO 00/01417 A (CYCLACEL LTD ; WANG SHUDONG (GB); FISCHER PETER MARTIN (GB)) 13 janvier 2000 (2000-01-13) cité dans la demande le document en entier	5

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 mai 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/06/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Loubradou, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 03/03951

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DEROSSI D (REPRINT) ET AL: "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery" TRENDS IN CELL BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD, XX, vol. 8, no. 2, février 1998 (1998-02), pages 84-87, XP002122131 ISSN: 0962-8924 figure 1; tableau 1</p>	5
A	<p>EGUCHI AKIKO ET AL: "Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 28, 13 juillet 2001 (2001-07-13), pages 26204-26210, XP002253384 ISSN: 0021-9258 cité dans la demande le document en entier</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Informations relatives aux familles de brevets

Numéro de l'Office International No

PCT/FR 03/03951

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0210201	A	07-02-2002	AU 8076701 A	13-02-2002
			CA 2417454 A1	07-02-2002
			EP 1305333 A1	02-05-2003
			WO 0210201 A2	07-02-2002
			US 2003119725 A1	26-06-2003
WO 0001417	A	13-01-2000	AU 756014 B2	02-01-2003
			AU 4519899 A	24-01-2000
			CA 2333145 A1	13-01-2000
			EP 1093383 A1	25-04-2001
			WO 0001417 A1	13-01-2000
			GB 2340121 A ,B	16-02-2000
			HU 0300246 A2	28-05-2003
			JP 2002519392 T	02-07-2002
			US 2003119735 A1	26-06-2003
			US 6472507 B1	29-10-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.